

BEST AVAILABLE COPY

⑩ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公表

⑬ 公表特許公報 (A)

昭61-500201

⑫ 公表 昭和61年(1986)2月6日

⑬ Int.Cl. ⁴	識別記号	序内整理番号	審査請求 未請求	部門(区分)
C 12 P 17/04		7732-4B	予備審査請求 未請求	1 (1)
C 12 N 1/00 1/16		6712-4B 6712-4B改		(全 16 頁)

⑭ 発明の名称 アスコルビン酸の生物活性による製造

⑮ 特 願 昭59-504007

⑯ 出 願 昭59(1984)10月19日

⑰ 翻訳文提出日 昭60(1985)6月20日

⑱ 国 旗 出 願 PCT/US84/01695

⑲ 國際公開番号 WO85/01745

⑳ 國際公開日 昭60(1985)4月25日

優先権主張 ④ 1983年10月20日 ④ 米国(U S) ④ 543975

② 発明者 ロランド, ジョン・フランシス アメリカ合衆国イリノイ州60025, グレンビュー, インディアン・ロード 735

③ 発明者 カイル, セオドア アメリカ合衆国ウイスコンシン州53217, フォックス・ポイント, ノース・ビーチ・コート 7451

④ 出願人 クラフト・インコーポレーテッド アメリカ合衆国イリノイ州60025, グレンビュー, ウォーキー・ラン・ロード 801, クラフト・コート

⑤ 代理人 弁理士 湯浅 勝三 外5名

⑥ 指定国 DK, J P, U S

最終頁に続く

請求の範囲

(1) レーガラクトン酸、レーガラクトン酸低級アルキルエster、シーガラクトノーガンマラクタトンおよびこれらの混合物よりなる酵から選択されるレーガラクトン酸系基質、ならびにエタノール、グリセロールおよびこれらの混合物よりなる酵から選択される炭素エネルギー源を含む生物活性用水性培地を用いし；前記発酵培地に、該基質からレーザコルビン酸を過剰生産しつつ炭素エネルギー源を利用できる微生物を加え；そして好気的条件下で前記微生物を増殖して該炭素エネルギー源を消費させかつレーザコルビン酸を蓄積させる；ことからなるレーザコルビン酸の製造方法。

(2) 認定エネルギー源がエタノールであり、レーガラクトン酸系基質がシーガラクトノーガンマラクタトンである請求の範囲第1項記載の方法。

(3) 生物活性用水性培地が該微生物の増殖に必要な窒素源および適度な無機塩質を含み、さらにレーザコルビン酸の生産を高めるのに十分な量のグリシンを含む請求の範囲第1項記載の方法。

(4) 生物活性用水性培地が該培地の全重量を基準にして少なくとも約0.5重量%のグリシンを含み、該培地のpHが約2.5～6.5の範囲である請求の範囲第3項記載の方法。

(5) 前記生物活性を少なくとも約20%の酸素飽和度の好気的条件下で行う請求の範囲第1項記載の方法。

(6) 前記微生物がカンディダ属であるか、あるいは突然変異原く例えば紫外線、X線、エトロジグアニジン、カブエ

イン、アクリフラビンもしくはその他の化学的または物理的炎熱変異原または組換えDNA技術によつて誘導される突然変異株である請求の範囲第1項記載の方法。

(7) エタノールおよびレーガラクトン酸系基質が既製副産物のラクトース原または柑橘類のペクチンから誘導される請求の範囲第1項記載の方法。

(8) ホエー、ホエー過濾物またはミルク過濾物をレーガラクトースおよびエタノールに転化し、該レーガラクトースを酸化してレーガラクトロン酸となし、該レーガラクトロン酸を還元してレーガラクトン酸基質を得る請求の範囲第7項記載の方法。

(9) レーガラクトロン酸がペクチンの酵素的加水分解により誘導され、該レーガラクトロン酸を還元してレーガラクトン酸基質を得る請求の範囲第7項記載の方法。

(10) レーガラクトン酸をラネニンフル、白金またはパラジウム触媒および水素で還元してレーガラクトン酸を得る請求の範囲第9項記載の方法。

(11) レーガラクトン酸を脱水してレーガラクトノーガンマラクタトンを形成する請求の範囲第7項記載の方法。

(12) 前記発酵をバッチ法、連続法、半連続法、フェードバック法(fed-batch)、溶解法または他の再循環法で行つてレーザコルビン酸を生産する請求の範囲第1項記載の方法。

(13) 前記微生物を適当な支持体を用いて固定するかまたは封じ込める請求の範囲第1項記載の方法。

(14) 前記発酵培地がレーザコルビン酸の生産を最大限に増加させかつその他のアスコルビン酸類似体の発酵を最小限に抑

えるような組合せて生炭素源としてのエタノール、レーガラクトノーガンマラクトンおよび他の有機成分ならびに無機成分を含む、請求の範囲第1項記載の方法。

(3) イオン選択性樹脂を用いて発酵プロセスまたは発酵培地からレーアスコルビン酸を回収する請求の範囲第1項記載の方法。

(4) レーアスコルビン酸過剰生産性でありかつ粗胚葉およびトコシドリア葉を接つてレーアスコルビン酸を導入することができる微生物。

(5) カンディダ ノルベゲンシス (*Candida norvegensis*) CBS 2145 の変異株よりなる酵から選択される請求の範囲第1項記載の微生物。

(6) 該微生物がカンディダ ノルベゲンシス ATCC 20686 およびその変異株または酵母よりなる酵から選択される請求の範囲第1項記載の微生物。

(7) エタノールおよびレーガラクトノーガンマラクトンを含む生物活性用培地を用意し；該活性用培地でカンディダノルベゲンシス ATCC 20686 、カンディダノルベゲンシス ATCC 20732 またはこれらの酵母もしくは変異株の酵母を好気的に培養して、エタノールを消費させかつレーガラクトノーガンマラクトンをレーアスコルビン酸へ転化させる；ことからなるレーアスコルビン酸の生産方法。

(8) 該微生物がカンディダ ノルベゲンシス ATCC 20732 およびその変異株または酵母よりなる酵から選択される請求の範囲第1項記載の微生物。

造方法。

(9) 炭素エネルギー源がエタノールであり、コーガラクソロン酸系基質がレーガラクトノロン酸低級アルキルニステルである請求の範囲第2項記載の方法。

(10) 前記微生物がカンディダ ウチルス (*Candida utilis*) NRRL Y-990 およびその変異株または酵母よりなる酵から選択される請求の範囲第2項記載の方法。

(11) 約0.01～2.0重量%のエタノール、約0.1～0.7重量%のレーガラクトノーガンマラクトン、約0.1～0.5重量%のグリシンと共に炭素源および無機複合物を含み、約6.5～2.0のpH を有するレーアスコルビン酸生産用活性用培地。

(12) 少なくとも約 1.5×10^{-1} ミクロモル/分/mg (蛋白質) の活性を有する固定化したレーガラクトノー1,4-ラクトンオキシダーゼ酵素を用なし；該固定化酵素を、少なくとも約2.0ミリモルのレーガラクトノー1,4-ラクトンを含む生物活性用培地と接触させ；固定化酵素と接触している該活性用培地中の炭素濃度を少なくとも約3.0 ppm に保つてレーガラクトノー1,4-ラクトンをレーアスコルビン酸へ転化させ、そして該レーアスコルビン酸を回収する；ことからなるレーアスコルビン酸生産のための生物活性方法。

(13) 前記生物活性用培地のpH が約6.0～7.5である請求の範囲第2項記載の方法。

(14) 前記固定化酵素をビーズの形で処理カラムに加え、そして該カラムに前記培地を過す請求の範囲第2項記載の方法。

(15) ローガラクトノロン酸、ローガラクトノロン酸低級アルキルニステルおよびこれらの中の混合物よりなる酵から選択されるローガラクトノロン酸系基質、ならびにエタノール、グリセロールおよびこれらの混合物よりなる酵から選択される炭素エネルギー源を含む生物活性用培地を用なし；該活性用培地に、該基質からレーアスコルビン酸を生産しつつ該炭素エネルギー源を利用して該微生物を加え；そして該微生物を好気的条件下に培養して該炭素エネルギー源を消費させかつレーアスコルビン酸を製

第一 総 論

アスコルビン酸の生物活性による製造

本発明はレーアスコルビン酸(ビタミンC)の発酵による製造方法、この種の発酵に特に適する微生物および発酵培地に関する。

発明の背景

レーアスコルビン酸は人間にとつて必須食品成分であり、自然界においては柑橘類の果物および植物中に含まれている。レーアスコルビン酸は通常既知方法により、例えば出発物質としてローダルコースを用いるライヒシュタイン(R. Reichstein)の米国特許2,315,111号に記載の方法により合成される。レーアスコルビン酸のその他の化学的合成方法および生物的製造方法も様々知られており、例えば米国特許2,702,808号、同第2,847,421号および同第3,721,603号に記載の方法が知られており、これらは一般に上記のライヒシュタイン方法の変法である。しかしながら、これらの方法は開示されるごとく出発物質としてグルコースを用いる比較的複雑な方法である。他の出発物質を利用する商業規模での新規方法が望まれるであろう。

英國特許第7,630,556号に記載される化学的一生物学的方法では、動物または植物の酵素組織に存在するデヒドロゲナーゼ(2.0.1.8.2.3)を用いてガムマラクトンの最終酸化を行うことによりレーアルゴルビン酸を得ている。同様の方法が米国特許第4,259,443号に記載されており、ここではラクトースのか水分解とエンドウ豆由來の植物デヒドロゲナーゼ酵素

(301.5.2.3)を利用してレーアスコルビン酸を製造している。この方法の効率については開示されていないが、商業規模でのこの方法の使用は前段をうけると思われる。

パン酵母および/またはビール酵母がレーガラクトノーラクトオキシダーゼ(酵)を含むことはすでに認められており、この酵素(酵)がレーアスコルビン酸生合成の最終活性化酵素、すなわちレーガラクトノーガンマラクトンを酸化してレーアスコルビン酸と過酸化水素とを製造する工程を経ると思われた〔エンザイモロフア(Enzymologia), 31, 42(1966); ヨーロ、ジエイ、バイオケム、(Eur.J.Biochem.), 127, 391(1972); およびエム、ニシキ(M.Nishikimi)らのアーチ、バイオケム、バイオフィジ、(Arch.Biochem.Biophys.), 191, 479(1978)を参照〕。炭素エネルギー源としてリードルコース(10%)を含む発酵培地内で増殖する酵母がエンザイモロフア(Enzymologia)のアスコルビン酸類似体を生成する能力についても研究された〔ヘイク(Heick)らのカナ、ジエイ、マイクロバイオロ、(Can.J.Microbiol.), 18, 597(1972)を参照〕。類似の研究において、カンドイダ(Candida)酵母株を選択、ヘキソースまたはペントース上で増殖させてアスコルビン酸類似体(ローエリトロアスコルビン酸)を製造した〔エス、ムラカワ(S.Murakawa)らのアグリタ、バイオロ、ケム、(Agric.Biol.Chem.), 40(6), 1265(1976)および同書41(9), 1799(1977)を参照〕。レーガラクトノーガンマラクトンを培地中に添加して酵母を増殖させた場合にはレーアスコルビン酸も確認された。ローエリトロアスコルビン酸

エリトロアスコルビン酸は種々の炭素源から作られたが、レーアスコルビン酸は発酵培地中にレーガラクトンが存在するとときに生産されるにすぎなかつた。

また、かなりの量のラクトースにテーズ製造の際に副産物としてホエー(乳液)、ホエー透過物またはミルク透過物の形で利用可能であることが知られている。これらの副産物の利用は長い間テーズ製造業者らにとて興心の的であつた。

ホエーまたは他のミルク由来の液状状態物から得られるラクトースを加水分解するとグルコースおよびガラクトースが得られることは以前から知られており(例えば米国特許第262550号、同第2626503号、同第2749242号および同第2661858号を参照)、またホエーを発酵させるとエタノールが生ずることも知られている(例えばフード・エンジニアリング(Food Engineering), 11月, 1977年, 74-75頁; 英国特許第1524616号を参照)。底巣副産物としてのラクトースを利用するのに適したレーアスコルビン酸の新規製造方法がとりわけ望まれるであろう。

従つて、本発明の主な目的はレーアスコルビン酸を製造するための底巣副産物を利用して新規生物活性方法を提供することである。本発明の他の目的は、底巣副産物であるラクトース(例えはホエー、ホエー透過物およびミルク透過物)をレーアスコルビン酸の製造に利用しする方法を提供することである。本発明のさらに他の目的は、レーガラクトノーガンマラクトンのような種々のローオおよびレーガラクトース衍生物の存在下にエタノールの好気的発酵によりレーアスコルビン酸を製造する

ことができる微生物を提供することである。さらに他の目的はレーアスコルビン酸の微生物学的製造特に適する発酵培地を提供することである。これらおよび他の目的は既刊の図面および以後の詳細な説明から一層明らかになるであろう。

図面の説明

第1図は本発明に從つて底巣副産物であるラクトースからレーアスコルビン酸を製造する方法の1つの実施原理を示す一連の工程図であり。

第2図はレーガラクトノーカーラクトオキシダーゼ活性についてのミトコンドリア活性を示すグラフであり、

第3図はレーガラクトノーカーラクトオキシダーゼ活性のミトコンドリアでのアスコルビン酸製造を温度の関数として示すグラフであり、

第4図はレーガラクトノーカーラクトオキシダーゼ活性のミトコンドリアでのアスコルビン酸製造を時間の関数として示すグラフであり、

第5図はレーガラクトノーカーラクトオキシダーゼ活性のミトコンドリアでのアスコルビン酸反応速度 V_0 を示すグラフであり、そして

第6図はレーガラクトノーカーラクトオキシダーゼ活性のミトコンドリアでのアスコルビン酸製造についての K_m および V_{max} を測定する際の逆基質濃度に対する逆ミトコンドリア反応速度 V_0 を表わすグラフである。

発明の説明

一般に本発明によれば、レーガラクトノーガンマラクトン、

レーガラクトン酸の低級アルキルエステル、レーガラクトン酸およびこれらの混合物による肝から選ばれるレーガラクトン酸系基質の水性相での好気的生物活性によるレーアスコルビン酸の製造方法が提供される。以後にさらに詳しく論じるように、レーガラクトン酸系基質は適当な方法で、例えばローガラクトースの酸化および柑橘類に含まれるペクチンのようないベタチノンの加水分解により得られる。特に好適なレーガラクトン酸系基質はレーガラクトノーガンマラクトンである。また、この種の方法によれば、エタノール、グリセロールおよびこれらの混合物による肝から選ばれる酵母の炭素供給ニキルギー源をその発酵において利用することができる。特に好適な炭素源はエタノールである。

好気的生物活性による微生物の選択および利用は本方法の重要な特徴になつてゐる。これに質して、レーアスコルビン酸の合成において過剰生産性でもりかつレーガラクトン酸系基質からレーアスコルビン酸を蓄積する微生物を発酵培地に供給することが望ましい。レーアスコルビン酸の合成において過剰生産性でもる微生物とは、自然突然変異または遺伝子操作のいずれかによつて発酵プロセスの全容量に基づいて発酵培地1>当たり少なくとも約0.8%の量で代謝産物としてのレーアスコルビン酸の高められた生産が可能である微生物を意味する。

レーアスコルビン酸の生産は特定の微生物を用いてレーガラクトン酸系基質の存在下にエタノールを発酵させることにより実現される。レーガラクトン酸系基質からのレーアスコルビン酸の製造において過剰生産性でもりかつ逆基質濃度を利用し

る酵母およびカンディダ属の特定部分が特に好みしい。しかし、他の適當な微生物（適切に遺伝子修飾された微生物を含む）、例えばハンセンラ（*Hansenula*），サツカロミセス（*Saccharomyces*），タリエベロミセス（*Kluyveromyces*），デバロミセス（*Debaromyces*），ナソニア（*Nadsonia*），リポミセス（*Lipomyces*），トルロブシス（*Torulopsis*），クレケラ（*Kloeckera*），ピテア（*Pichia*），ゾウサンカロミセス（*Schizosaccharomyces*），トリゴノブシス（*Trigonopsis*），ブレッタノミセス（*Brettanomyces*）またはシュワエオミセス（*Schwannomyces*）のような他の属の酵母もいくつかの情況では使用することができる。

本発明の種々の観点によれば、使用する微生物は酸化作用における主な収率としてエタノールを利用することができます、その結果レーガラクトノーガンマラクトンの生物活性を行つて少なくとも約：2/3の収量でレーアスコルビン酸を生成することができるものであればよい。しかし、カンディダ属に属し、かつレーアスコルビン酸の生産に必要とされる特性を有し、さらに生物活性プロセス中の生産物の輸送および好気的条件下でのアルコールの高められた代謝能力などの特性を有する突然変異株が好適な微生物である。しかし、ある場合には細胞内に有意量の生産物を蓄積する株も利用価値がある。また、特に好適な炭素源はエタノールであるが、グリセロールも増殖用炭素源および/またはレーアスコルビン酸もしくはその他のエンジオール化合物の生産用炭素源として有用であることが認められている。炭素源を過ぶための決定的要因はそれがレーアスコ

ルビン酸の異性体へ転化されないということである。酵母はそれらがレーアスコルビン酸を生成しつつ蓄積する能力を有するものでありさえすれば自然界に存在する株、人工的に突然変異を起こされた株または遺伝子操作により作られた株でもつてよく、とりわけカンディダ属のものが好適である。

適切な突然変異株は紫外線(UV)の照射およびまたは化学的突然変異原（例えばヨーメチルーバードニトローニトロソグアニン、メタヌスルホン酸エチル、亞硝酸、アクリラビンおよびカフエイン）への曝露のような通常の突然変異方法により誘導される。組換えDNA技術もそうであるが、プロトプラスト融合または電気融合を行つて改良された組換え体を作るとこれらの過剰生産性酵母株のハイブリダイゼーションも使用できる。また、多くの属の酵母は適当な条件下でレーアスコルビン酸またはその類似体を生成するように誘導されうることが認められている。アスコルビン酸の製造において過剰生産性のこの種の株はアスコルビン酸の大半を細胞内に蓄積してもよく、従つて細胞の自己分解が起こるまでアスコルビン酸は放出されない。しかし、レーアスコルビン酸を発酵培地から非常に簡単に回収する発酵方法においては、微生物が生産物を培地へ輸送するのが好適である。

従つて、本発明の特徴はレーアスコルビン酸生産物を細胞内に保持することなく、むしろ生産場所から発酵培地中へ輸送できる特定の微生物株を提供することである。レーガラクトノーガンマラクトン基質からのレーアスコルビン酸の製造に携わる酵素系は酵母のミトコンドリアと関係があるようと思われる。從

つて、レーガラクトノーガンマラクトン基質は発酵培地から細胞を横切り、さらにミトコンドリア膜を通過して輸送されねばならない。同様に、レーアスコルビン酸反応生産物はミトコンドリア膜と細胞壁を通して発酵培地に入るよう選ばれねばならない。レーアスコルビン酸を発酵培地に蓄積させるために、細胞壁とミトコンドリア膜を通過するこのような望ましい輸送特性を有する微生物株が提供される。これに関して、本発明の特徴に好適な突然変異株では、レーアスコルビン酸またはその類似体生産物の大半をトロボ相（*tropophase*）およびイディオ相（*idiophase*）の生長段階中に発酵培地へ輸送するところの後で述べるカンディダ属変異株のような選ばれた酵母種および株が利用される。本発明によれば、レーガラクトン酸系基質（特にレーガラクトノーガンマラクトン）を好気的に酸化してレーアスコルビン酸を製造しつつ突変的にそのレーアスコルビン酸のみを蓄積するのに特に適した新規微生物が提供される。エタノールを好気的条件下で代謝する優れた能力をもつ微生物でもつて、かつレーアスコルビン酸を水性発酵培地中に供給するように細胞壁とミトコンドリア膜を横切つてレーアスコルビン酸を輸送できる微生物が特に好みしい。

エタノール含有標準発酵培地（M-1）および特別のグリシン含有培地（グリシン培地）（各培地は0.5重量%のレーガラクトノーガンマラクトンもまた含有する）で増殖せるととき、レーアスコルビン酸を生成しつつ蓄積する人工的に突然変異を起こさせた酵母の特に好みしい例はカンディダノルベゲンシス・クラフト社 M-56 (*Candida Norvegensis* Kraft,

M-57-56) である。この菌株はメリーランド州ロングビーチのアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (American Type Culture Collection) に ATCC 20686 として寄託された。その他の改良された突然変異株はカンディダノルベゲンシス クラフト社 M-78 であり、この菌株はアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに ATCC 20722 として寄託された。これらの酵母種は一連の突然変異誘発方法によつてカンディダノルベゲンシス CB 02145 から選択、単離された突然変異株である。

レーアスコルビン酸過剰生産性菌株 M-56 (ATCC 20686) の系図、ならびに標準発酵培地およびグリシン発酵培地でのレーアスコルビン酸の収量を次の表に示す。

表 I

カンディダノルベゲンシスからのレーアスコルビン酸過剰生産性菌株の系図

カンディダノルベゲンシス	生産されたレーアスコルビン酸 (g/L)	
	M-1	グリシン培地
M-2145 (KMS)	0.09	0.30
M-27 (UV)	0.015	0.60
M-34 (UV/GAP)	0.020	0.72
M-39 (UV)	0.80	0.75
M-42 (NTC)	0.50	0.69
M-54 (NA)	0.33	0.75
M-55 (Ni ²⁺)	0.34	0.80
M-56	0.34	1.07

先端はエタノール 1.5 滴（重量/容量）およびレーガラクトノーガンマラクトン 0.5 滴を含有する溶液培地を入れた耐化粧瓶の 500 ml エルレンマイヤーフラスコ内で 30°Cにおいて 48 時間実施した（400RFM）。先代の菌株から後代の菌株をつくるのに用いた突然変異誘発剤または過剝処理を次の略号：UV = 紫外線； EM 8 = メタンスルホン酸エチル； NTG = N-メチル-N-ニトロ- β -ナフソジアミン； NA = 亞硝酸； OA = オーカフェイン； N_1^{+2} = レーガラクトン酸ニブケル； に従つてカッコ内に示す。

レーアスコルビン酸過生産性突然変異株のスクリーニング方法は、大多数の菌株に対して突然変異誘発処理を施し、次にアスコルビン酸の生産レベルに基づいて菌母コロニーを選択することにより行われる。アスコルビン酸の生産レベルは、微生物に感受性の培養培地で突然変異誘発処理の早期段階を増加することにより監視できる。例えば、炭酸カルシウム粉末のような強感受性物質を用いて培養培地を不透明にする。増殖している菌母コロニーが環を生産すると炭酸カルシウムが溶けることによりそのコロニーをとり囲む区域が透明になる。その透明区域の直径（mm）/コロニーの高められた微生物の直径として増大する。

○、ノルベゲンシス MF-39 と命名した表 I の系図の培養物の 1 つに関して、その突然変異誘発処理およびスクリーニングのためのデータを次の表 II に示す。

表 II に記載の実験において、選れた生産性の変異株はそれらの段階単位値（AU）を基準にしてスクリーニングした。これに関して、突然変異誘発処理後に菌株および生存株を原指示培地に移置し、30°Cで 96 時間インキュベートしてそれらの AU 値を測定した。この前記の指示培地は寒天、エタノール 1.5 滴（重量/容量）、レーガラクトノーガンマラクトン 0.5 滴、グルタミン酸モノナトリウム 0.2 g、および不透明化剤としての $CaCO_3$ 0.3 g を含有する SM-1 培地であつた。AU 値とは透明区域の直径（mm）/コロニー区域の直径を意味する。表 II では、その第 1 桁に 0, 15, 30, 45, 60 および 70 秒の突然変異誘発 UV 曝露時間と示し、その下のカッコ内にその曝露時間での全生存培養物のパーセントを示す。各曝露時間に関して、段階単位値の 5 つの異なる区段寸法のそれぞれに対する生存コロニーの数およびそのパーセントを表 II のそれぞれの欄に示す。生産性の評価については表 I に記して述べたようないづれかの試験を用いる。最高の段階単位値を有する突然変異株の中から MF-7-42 株が選ばれた。

すでに示したように、本発明によればレーアスコルビン酸過生産性菌株の突然変異株ならびにその菌株の系図の説明が提供されかつ利用される。これに関して、MF-7-56 株（表 I 参照）のその後の突然変異は、次の表 II に示すように、レーアスコルビン酸に関するさらに一層過生産性の突然変異株を提供すべく行われる。

D.F. 菌株	レーアスコルビン酸過生産性菌株の選択				
	0-1.0	1.0-1.5	1.5-2.0	2.0-2.5	2.5
UV	4.64/4.68	4/4.68	—	—	—
(100% 生存)	9.81/4.9	0.656	—	—	—
1.5 分	2.00/3.13	0/3.13	0/3.13	—	—
(13.66% 生存)	0.584%	2.56	1.59%	—	—
3.0 分	4.423/4.480	2.7/4.480	1.8/4.480	2/4.480	—
(4.85% 生存)	0.34%	7.4	9.6	0.58%	—
4.5 分	3.43/5.00	3.0/5.00	1.08/5.00	1.8/5.00	1/5.00
(0.52% 生存)	6.85%	0.4	2.16%	3.6%	0.20%
6.0 分	3.0/2.7	—	6/3.7	1/3.7	—
(0.03% 生存)	8.108%	—	1.621%	2.7%	—
7.5 分	2.77/2.86	7/2.86	2/2.86	1/2.86	1/2.86
(0.1% 生存)	9.618%	2.43%	0.69%	0.34%	—

表 III
MF-56 (ATCC 20686) からのレーアスコルビン酸過生産性菌株の系図

カンドイド	ノルベゲンシス	生産されたレーアスコルビン酸 (%)
MF-56 (UV)		1.07
MF-57 (UV+Vn+2 Res)		1.10
MF-61 (UV)		1.30
MF-61' (Oo137)		1.31
MF-64 (EzBr)		1.34
MF-72 (UV)		1.38
MF-77 (UV)		1.43
MF-78		1.77

先代菌株から後代菌株をつくるのに用いた突然変異誘発剤または過剝処理をカッコ内に示す。突然変異誘発剤または過剝処理は次のように表わされる： EM 8 = メタンスルホン酸エチル； UV = 紫外線； NTG = ニトロソジアミン； N_1^{+2} = ニンケル塩鉱体； Oo137 = セシウム 1.37 ガンマ線； EtBr = 噻化エチジウム； Na = 亜硝酸； Vn+2 = メタバナジウム酸アンセニウム。表 III に記載のレーアスコルビン酸過生産性は表 I に記して先に述べたようないづれかの試験によって得られる。

○、ノルベゲンシス クラフト社 MF-56 变異株 (ATCC 20686)、○、ノルベゲンシス クラフト社 MF-78 变異株 (ATCC 20732)、および○、ノルベゲンシス 0862145 菌株の形態学的、生理学的ならびに培養上の特性は、「原母、

分類学的研究 (The Yeasts, a taxonomic study) * [ジェイ・ロッダー (J. Loddar) 著者, 1970年, 北オランダ発行所、アムステルダム] および "酵母の新規証書 (A New Key to the Yeasts)" [ジェイ・エイ・ペーネット (J. A. Bennett) およびアル・ジェイ・パークハースト (R. J. Parkhurst) 著者, 1974年, 北オランダ発行所、アムステルダム] に示される酵母に関する記述と一致する。形態学的試験および同定試験を以下に示す。

25°Cにおいて麦芽エキス上で増殖させる場合、細胞は (2~8) × (5~13) ミクロロンの円筒形ないしおよび球形である。コロニーはクリーム色をしており、光沢があり、軟らかく平滑である。ホルクエル (Holleuel) のアモニアート麥芽培地上では子座胞子を作らない。

表 N

炭素の同化		
化合物:		
グルコース	+	エタノール
ガラクトース	-	メタノール
レーゲルガース	-	グリセロール
シュタロース	-	エラトリトール
マルトース	-	リビトール
セロビオース	+	ガラクチノール
トレハロース	-	マントロール
ラクトース	-	ダルシトール
メリビオース	-	メチル-ロ-
		グルコシド
ラフィノース	-	サリシン
メレナトース	-	アルブチン
インジルリン	-	リ-乳酸
可溶性澱粉	-	コハク酸
D-キシロース + 潜在または	-	タエン酸
L-アラビノース	-	イノシトール
D-アラビノース	-	グルコノ-デルタラクトン
D-リゴース	-	2-ケト-グルコネート
L-タムノース	-	5-ケト-グルコネート
	-	D-グルコサミン

KHO₂O 同化: 隣性

添加ビタミン類なしでの増殖: 隣性; テアミン, ピタミンおよび

ビビリドキシンを必要とする

増殖のための最高温度: 41~45°C

* 場合によりわずかに同化する

本実験の他の特徴は、エタノールからD-グルコース生成の代謝過程を抑制しかつL-エリトロアスコルビン酸の形成を最小限に抑える水性発酵培地ならびにその発酵条件を提供することである。特に好適な水性発酵培地はL-アスコルビン酸の回収が簡単でありかつL-アスコルビン酸の微生物学的製造を高めるものである。適切な水性発酵培地を提供することは本実験方法にとってかなり重要であり、そして最もよい発酵培地の選択および提供は発酵で使用する特定の微生物の機能にも一部関係する。また適切な発酵培地の提供は以後に詳しく述べるイオン交換樹脂分離方法を含む分離技術による一層効果的なL-アスコルビン酸の回収方法をも提供する。

発酵培地中においてエタノールは炭素源として利用され、その初期濃度は使用する特定の菌株に応じて約0.1~2.0%重量(%) / 容量(mL) (以後%Vと記す) の範囲が好ましい。エタノールが生物活性中に消費されると、それは酵母が耐えられる濃度でありかつ増殖またはL-アスコルビン酸の生産を阻害しない最高濃度(約0.1~2.0%V) へと断続的に補足される。

この種の方法のいろいろな観点によれば、生物活性用の水性培地はエタノール、グリセロールおよびこれらの混合物よりも酵母から選ばれる4倍より少ない炭素原子をもつ炭素発酵エキ

ルギー源と、L-ガラクトノーザンマラクトン、L-ガラクトン酸およびこれらの混合物よりも酵母から選ばれるL-ガラクトン酸系炭素とを含むものが用意される。一般に、その発酵培地は選ばれた微生物の増殖にとって必要な栄養素をさらに含み、また培地のpHは約2.5~6.5の範囲であるのが好ましい。一般に、水性発酵培地には、発酵培地の全重量を基準にして、少なくとも約0.01重量%, 好ましくは約0.1~2.0重量%の炭素源が加えられるだろう。炭素源は発酵中に消費され、そして発酵期間中に定期的にまたは連続的に追加される。同様に、発酵培地の全重量を基準にして少なくとも約0.1重量%の発酵基質がその培地中に加えられることが望ましい。総合による発酵のためには、一般に発酵培地は酵素液、種々の有機炭素源および種々の無機物質を含むだろう。

酵素液(一般に水性発酵培地の全重量を基準にして約0.1~0.5重量%の量で用いられる) は、それを最大利用するそれぞれの酵母の能力に応じて、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、塩化アンモニウム、氯化アンモニウム、尿素または水酸化アンモニウムの形のアンモニウムイオンなど、およびこれらの混合物からなる代謝可能な营养化合物群から選ばれる。培養培地または発酵培地を調合するにはさらに多くな量のアミノ酸(例えばグルタミン酸モノナトリウム、グルタミン、アスパラギン酸など)、プリン類(アデニン、チミン)、トクモロコシ浸出液、酵母エキス、蛋白質加水分解物のような有機炭素源; Ca, Mg, K, Fe, Si, Co, Cu, Mn, Mo, Zn の無機塩または塩酸塩のような無機塩; およびビタミン類(例

特許昭61-500201(7)

えば水溶性のビタミンB群)が添加される、この種の作用を効果的に行う培地の1つに先に述べたSM-1エタノール培地がある。この培地の組成特性は次の通りである。

SM-1 培地	
	量 g/l
A. 葡萄糖-エタノール(重量/容量)	15.0
B. 選択-基質	2.0
C. 活動成分-トウモロコシ浸出液	5.0
D. 無機塩	
-K ₂ RPo ₄ .3H ₂ O	1.0
KH ₂ PO ₄	3.0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5
NaCl	0.1
KCl	0.1
Rb ₂ SO ₄	0.0005
ZnO _{1.5} H ₂ O	0.0002
MnSO ₄ .H ₂ O	0.0004
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.0004
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.0004
KI	0.0001
(NH ₄) ₂ WO ₄ .4H ₂ O	0.0002
E. ビタミン-チアミン HCl	0.004
ビオチン	0.00002
F. 生物活性化合物-レーガラクトノーガムラクタン	5.0
G. pH 4.0 調節	

選ばれた酵母変異株を適当な培養条件下にこの培地で増殖させると、本質的にレーガラクトノーガムラクタンの生物活性化生成物として培地中に生成される。この増殖の移行培地またはその他の培地(以後詳しく述べる)もより有利であることが見出されている。培養条件は一般的に約20~37℃の適温範囲、好ましくは約30℃である。生物活性化は約6.5~2.5のpH範囲、好ましくは約4.0のpHで行なうのが望ましい。最適培養条件は使用するそれぞれの酵母株によって決まるだろう。実際方法は1~7日間を要し、好気的条件下に行われる。レーガラクトノーガムラクタンの生物活性化法において高密度の酵母細胞ペイオマス(生物活性化培地1/4当たり25~240gの生細胞)を使用する場合、酵素欠乏条件の発生を防ぐためにその過剰方法に対して純粋酵素または酵素に富む空氣を補足する必要があり、またこうすることが収量を高めるために望ましいかも知れない。水性培養培地は少なくとも約2.5ppmの酸素を保つようにするのがよく、好適には約2~5ppmの範囲の所定のレベル以下に酸素含有量を低下させない方がよい。

前記のSM-1培地のような標準培養培地は本発明によるレーガラクトノーガムラクタン基質からのレーガラクトノーガムラクタンの製造において有利に利用されうるが、全ての増殖または発酵は、培地の全重量を基準にして少なくとも約0.5重量多く(好ましくは約0.6~0.8重量も)のグリシンを含む培地を用いて行なうのが特に好適である。培地中の約0.7重量%のグリシンは収量增加という点でとりわけ効果的であることがわかつた; これ

に関して、この種の高グリシン培地はレーガラクトノーガムラクタンの収量生産性を約3倍またはそれ以上高めるらしいことがわかつた。本明細書に記載の発酵において特に有用であることが立証されかつ本明細書で「グリシン培地」として認められるグリシン発酵培地の成分は次の通りである。

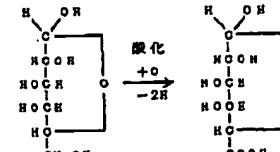
グリシン 培地	
成 分	量(g/l)
エタノール	2.0
グリシン	7.0
CBL 7/V	5.0
グルタミン酸モノナトリウム塩	2.0
NH ₄ Cl	1.0
MgSO ₄	0.5
無機混合物	2.0

上記無機混合物は次の成分からなる:

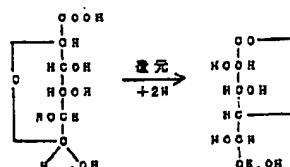
EDTA (2Na)	5.0 g/l
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.22
CaCO ₃ .2H ₂ O	0.735
MnSO ₄ .H ₂ O	0.6725
PbSO ₄ .7H ₂ O	0.915
(NH ₄) ₂ WO ₄ .4H ₂ O	0.10
CoSO ₄ .5H ₂ O	0.25
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.293

高グリシン培地は高グリシン含量のゼラチンのような蛋白質を加水分解し、その加水分解物をアスコルビン酸過剰生成微生物用の増殖培地の発酵に直接利用することにより商業規模での操作に対して提供される。

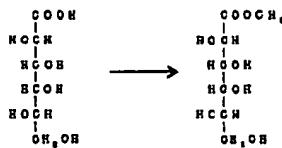
さらに詳しく述べると、レーガラクトノーガムラクタンの製造または酵素の最も効率的であるラクトースを加水分解してグルコースとローガラクトースとなし、次にローガラクトースを酸化してローガラクチロン酸をつくることにより前記ラクトースから製造するのが望ましい。



ローガラクチロン酸はこの他に柑橘類のペクチンなどのペクチン質を加水分解(例えば酵素による加水分解)しても得られる。このローガラクチロン酸は還元してレーガラクトノーガムラクタンとなし、これを脱水してレーガラクトノーガムラクタンを製造する。



レーガラクトン酸の各種酵素体（特に低級アルキルエステルを含む）はレーガラクトン酸の使用エステル化反応によって製造できる。



等に好適な生物活性方法では、細胞バイオマスを作るための過剰生産性微生物の増殖を、第1段階の発酵として、レーガラクトン酸系基質を含む適度な培養培地中で行い、こうしてその後の生物活性方法で利用するための細胞量を得る。すましくは、「この増殖培地は先に述べたように少なくとも約0.2ターラー（L/100ml）の高アリシン含量を有するだろう。第1段階の発酵はレーアスコルビン酸を直接生産しないので、この培養用発酵培地はエタノールを含む必要がない、容易に利用しうる普通の炭素源（例えばグルコース）を用いることができる。第1段階の増殖発酵系（好適には細胞増殖を最大限とすべく処方される）からの細胞バイオマスを回収し、これを使用して高細胞密度の生産化用培地（この培地は細胞増殖を最大とするよう処方される必要がない）を用意する。すましくは、この高細胞密度の生物活性用培地は、培地1L当たり少なくとも約5.0ターラー（乾燥細胞重量）、好ましくは約2.5～1.00ターラー（乾燥細胞重量）のアスコルビン酸過剰生産性微生物を含むだろう。この

種の高細胞密度系にエタノール炭素源とレーガラクトン酸系基質を加えると、レーアスコルビン酸を高濃度で生産する生物活性反応が生ずる。

生物活性を行う場合に、好気的条件は微生物が基質を酸化して、その微生物学的酸化によつてレーアスコルビン酸のみが実質的に生産される条件下に維持される。その後、以後に詳しく述べる適切な方法で好気的発酵により生じたレーアスコルビン酸を回収する。

生物活性の間は好気的条件を保つことが必要であり、これに関する、水性発酵培地は発酵中に少なくとも2.0ターラー（例えは2.0～3.0ターラー）の溶解酸和度（例えは2～3 ppmの炭素）を保つようにするのが望ましい。好気的条件は炭素に富む気体を発酵培地中導入し、エアーリフト反応器（air lift reactors；発酵培地中に炭素を効率的に分散する）のような発酵装置を利用することによって維持される。

すでに述べたように、生物活性条件下主な炭素エネルギー源としてエタノールを用いること、レーガラクトノーガンマラクトンは実質的に全部レーアスコルビン酸へ転化される。例えは、0.5重量ターラーのレーガラクトノーガンマラクトンを含むBターラー-1培地中でエネルギー源としてヘキソース糖（6-炭素エネルギー源）を用いるよりもむしろエタノール（2-炭素エネルギー源）を用いてカンドウダイモ酢酸を増殖せるととき、実質的にレーアスコルビン酸のキが形成されて他のアスコルビン酸類似体（例えはD-エリトロアスコルビン酸）の生産は最小限に抑えられる。このことはレーアスコルビン酸を産業的興味の水

準で生産する実用的方法の実現において重要な要素となる。

生物活性方法において、レーガラクトノーガンマラクトンは細胞内の1種または少數の炭素によって構造的に同様の生成物へと転化される。この方法は増殖しつつある細胞、休止している栄養細胞、乾燥細胞、または各種の有機ポリマー（例えはエカルジーナン、アルギン酸ナトリウム、ガリアクリルアミド、ゼラチン、底天またはその他のマクロ孔質樹脂）あるいは無機化合物（例えは藍青石およびシリカ）に固定された細胞を用いて行われる。活性炭素を含む細胞のミトコンドリアを生物活性を行わせるべく単離して固定化することもできる。

レーアスコルビン酸の生物活性方法は通常の好気的発酵方法、例えはバッチ法、連続法、半連續法で操作される。また、高密度のバイオマスを得るために使用できる培養方法、例えは透析培養法、細胞分離液を備えた半バッチ法およびフェード-バッチ（fed-batch）法も使用でき、この場合は空気への炭素の供給が必要となる。

本発明について一般的に述べてきたので、本発明の種々の面を今や第1図のプロンクダイヤグラムに示す方法的具体例に因してより詳しく説明するであろう。

第1図はホエー、ホエー透過程またはミルク透過程のような飼料副産物のラクトース溶液1.0からレーアスコルビン酸を製造する方法の1つの実施形態を図式的に示す。飼料副産物のラクトース溶液は一般に約4.5～5.0重量ターラーのラクトースを含み、これを加水分解するとグルコース-ガラクトース溶液1.2の形でその構成成分糖のグルコースとガラクトースとを生

ずる。この加水分解は*X. fragilis* (*X. fragilis*) または*E. lactis* (*E. lactis*) 由来の酵母ラクターゼ酵素もしくは*A. niger* (*A. niger*) または*A. oryzae* (*A. oryzae*) 由来のカビ酵素を用いて慣用方法で行われる。酵素は過量のもの、封じ込められたものまたは固定されたもののどれを使用してもよい。

グルコース-ガラクトース溶液1.2またはラクトース溶液1.0は、アルコール発酵を行う際に必要または所要により慣用方法で蛋白質または無機物質を除去することができる。加水分解処理工程によって得られたグルコース-ガラクトース溶液を濃縮して、例えは溶液の全重量を基準にして約1.5～3.0重量ターラーの固形分を含む溶液を得てもよい。一粒に、ラクトース以外の固形分含量は全固形分の約0.5～1.0重量ターラーの範囲であり、從つてこの溶液のグルコースおよびガラクトースの全含有量は溶液の全重量を基準にして約2.0～約2.5重量ターラーの範囲であるのが望ましい。

通常の酵母発酵方法に従つてトクモロコシ浸出液または酵母エキスのような適当な炭素源を相対した後、グルコースからのエタノール発酵用の適当な酵母菌株、例えはビール酵母（*S. cerevisiae*）の選ばれた菌株を使用して無気的の条件下でグルコース-ガラクトース溶液1.2を発酵させ、発酵培地のガラクトース成分を実質的に消費することなくグルコースをエタノールと二酸化炭素へと転化する。この方法でエタノール-ガラクトース溶液1.4が得られる。

このエタノール-ガラクトース発酵物は一般に重量/容積比

率で少なくとも約5%のエタノール、および発酵物1/4の容量および重量基準で少なくとも約10重量%のD-ガラクトースをそれぞれ含む。発酵物1/4を還元してアルコール1/6を除き、その後所定によりアルコール1/6を還元して1/9のブレーフのエチルアルコールを得てもよい。このアルコール1/6は発酵において使用する過酸化物のための炭素エネルギー源として役立てるために、レーアスコルビン酸発酵方法で利用することができる。

統いて、エタノールの除去後に回収されたD-ガラクトース含有高濃度液をさらに適当な方法で濃縮して、溶液の全重量基準で約20~75重量%の範囲の全固体分含量を有するガラクトース溶液を得る。すましくは、全浓度重量基準で約10~62重量%のガラクトースを含む。このガラクトース溶液を結晶化すると、精製されたD-ガラクトース1/6が得られる。所産により、発酵培地への無機栄養素の補給として、レーアスコルビン酸発酵において無機塩20を利用し得る。また、イオン交換によってガラクトースを発酵成分の残部から分離することもできる。この種のガラクトースは直接反応剤1/6の原料として役立つ。

D-ガラクトース1/6は接触酸化によってD-ガラクトロン酸2/2へ転化される。D-糖類のためのこの酸化工程を行う方法は当技術分野でよく知られており、ライヒシュタインの米国特許第2265121号に記載されている。保根D-ガラクトース(アセトン)をD-ガラクトロン酸生成物へ転化するには各種の触媒、例えば白金またはパラジウム触媒を使用する。次

に、保根D-ガラクトロン酸を通常な水素添加触媒(例えばラネーコケルまたはパラジウム)および水素ガスでの量などの適切な還元工程で還元してレーガラクトン酸2/4を製造する。この化学的還元方法も当技術分野で知られており、例えばエイチ・イスペル(H. Isbell)のジェイ・レス・ナト・ブル・ストーズ(J. Res. Natl. Bur. Stand.)、38, 45~60(1944)に記載されている。蒸留による次の除去および脱塩し一級の場合はレーガラクトノーガンマラクトン2/6を生成させ、これはレーアスコルビン酸を製造するための本発明の微生物学的転化方法において利用される。レーガラクトン酸エステルおよびレーガラクトン酸のような他のガラクトース誘導体も利用できるが、利用効率が劣るためにレーアスコルビン酸の収量は減少する。5-ケト-レーガラクトン酸のようなケト誘導体は本明細書に記載の好適な酵母菌株によつて利用されない。レーガラクトノーガンマラクトン2/6、エタノール1/6および適当な有機無機栄養素を合わせて、選ばれ元レーアスコルビン酸還元生産性菌株用の発酵培地2/8を始まる。

レーアスコルビン酸の発酵方法は慣用の液体通気発酵器、例えば30リットルのニュー・ブルンズウイック・サイエンティフィック発酵器(New Brunswick Scientific Fermentor)で実施される。生産物形成の監視および細胞環境の制御はマイクロコンピューターへ連絡した物理的および化学的センサーを使用してエタノール、圧力、液浸没、供給ガス、二段化炭素、排気酸素ガス、pHおよび溶存酸素を測定することにより行われる。

培養液、発酵によって生成されたレーアスコルビン酸はいろいろな方法、例えばイオン交換樹脂、低層またはイオン選択性膜、活性膜、酸塩-結晶化などを用いることにより堅明な発酵プロセスから回収できる。

発酵の経過は適当な分析方法を用いて監視する。レーアスコルビン酸およびその類似体の定量的検定は、2,6ジクロルインドフェノールでの酸化還元-滴定[エヌ. ジー. パートン(N. G. Burton)らのジェイ・アソス、バブ、アナリスト(J. Assoc. Pub. Analysts), 17, 105(1979)を参照]および高活性液体クロマトグラフィー[ジェイ・クロム、(J. Chrom.), 196, 163(1980)を参照]ならびに電気酸化還元法[エム. エイ. ベア(M. A. Pachols)のアナル. クロム(Anal. Chem.), 48, 364(1976)を参照]を用いて行われる。アスコルビン酸オキシダーゼ[ベーリングマーンハイム(Behring-Mannheim)社製]の使用をともなう酵素的方法も行うことができる。

発酵プロセス中のレーアスコルビン酸生産量が最大になつたとき発酵を終了する。レーガラクトノーガンマラクトンの未転化部分は再利用する。

本発明の種々の面を次の実施例に關してさらに詳しく説明するが、これらの実施例は本発明の範囲を規定するものではない。

実施例1

30リットルのニュー・ブルンズウイック液体発酵器を用いて、レーアスコルビン酸製造のための液体バッチ発酵を行つた。トウモロコシ液出液0.25%, 硫化アンモニウム0.1%, グリ

シン0.7%, 酵母マクシケム・7 H₂O 0.05%, ブルタニン酸セノナトリウム塩0.2%, エタノール1.5% (v/v)および微量無機質混合物0.3 mMから成るグリシン培地1.5LをpH 4.2に調節して、1/2 Lで30分間滅菌した。(なおここに示した値は特に指しがない限り重量%を意味する。)冷却後、低温滅菌したレーガラクトノーガンマラクトン0.5 Lを上記の無菌発酵プロセスに加えた。発酵器には30℃において回転振とう器(100 RPM)上の24エルレンマイヤーフラスコ内で増殖させたC.ノルベゲンシス K00 MF42(撰1)の24時間0×1プロセス培養物5.00Lを接種した。

その発酵器は30℃, 250 RPMおよび0.25容積/容積/分の通気速度で運転し、最初pHを4.0に保つた。24時間後、上清プロセスは0.084 P/Lのレーアスコルビン酸を含んでいた。追加の27.0%は酵母細胞中に存在していた。48時間後、堅明なプロセスは0.43 P/Lのレーアスコルビン酸を含み、細胞は2.9.6% Lを含んでいた。使用のイオン交換樹脂による低層および宿題を行つて生産物を回収し、統一色、再充填および結晶化を行つた。

実施例2

カンディダ属酵母およびその変異株を用いるレーアスコルビン酸の生産に対して、高密度バイオマスを使用して生産物を回収する方法強化系が開発された。この方法ではK00 MF-42酵母細胞を液体発酵器を用いて8 H-1培地(EtOH 1.5% v/v, レーガラクトノーガンマラクトン0.1%)で18時間培養し、そして無菌条件下に遠心分離した。遠心分離で外られ

大細胞ペーストはその後細胞の新しいS X-1培地（エタノール1.5%，グルタミ酸モノナトリウム塩0.2%，レガラクトノーガンマラクトン0.5%；pH 4.0）K3 7.5 g/Lの生細胞量まで細胞の増殖を避けながら再度培養した。そして飽和の6.5%の生存酸素レベルで酵素を通した。レーアスコルビン酸の生産は3.4時間で0.470 g/Lに増え、4.5時間では0.580 g/Lに増大した。培养中に培地のpHは2.6に下がった。

冷却、殺菌化した発酵プロセス4はローム・ハース（Röhm & Haas）社で製造したイオン交換樹脂、IR120(H⁺)樹脂の500 mLカラムに通した。洗出液と洗浄水を集め、100 mLの容量になるまで真空下37°Cで蒸発させた。冷エタノール100 mLを加えて、析出物（蛋白質）を5°Cで遠心分離（5000 RPM）することにより除去した。生産物は再び2.5 mLの容量になるまで蒸発させ、そして結晶化が完了するまで5日間0°Cで保存した。得られた結晶はアセトンで3回洗い、無アルコールに溶解して再結晶した。最初の収量では粗製レーアスコルビン酸結晶（HPLC）が約1.4 g回収された。

この他に、回収および精製は陰イオン透析樹脂（ダウエクタス1号）、アセテート形へのプロセスからのレーアスコルビン酸の収量および0.1 M R₅₀、での溶離によっても行うことができる。

実施例Ⅱ

カンディグ属細胞およびその変異株の休止細胞を使用して発酵液中にエタノールおよびレガラクトノーガンマラクト

ンからレーアスコルビン酸を生産する方法が開発された。酵母はエタノールとレガラクトンの両方を必要とする。得られた細胞は休止状態で、またに混々ガリーニークルに固定して、もしくはガリーニークルや無機化合物へ固定させて使用する。

この実施例では、S X-1培地で1.8時間培養した酵母細胞カンディグ・ノルベゲンシス DB8 + 1911を遠心分離にかけ、無機培養液（pH 4.5）で洗い、そしてエタノール0.8%およびレガラクトノーガンマラクトン0.5%を含む0.03 Mの酸性培養液（pH 4.5）50 mLあたり生細胞量5.0 gの濃度で再培養した。500 mLの脱化半胱酸のホウケイ酸ガラス製エルレンマイヤー・フラスコ中に混合物5.0 mLを入れて回転振とう器に載せ、300 RPMで30°Cにおいて通気した。エタノールの利用状況とレーアスコルビン酸の生産状況を追跡するためにプロセス試料を定期的に採取した。アルコール濃度を約0.3% /v/v に保つべくエタノールの添加を定期的に行つた。16時間後の酵母によるレーアスコルビン酸の収量結果を表Vに示す。

表 V

使用した微生物	収量したレーアスコルビン酸	時間
D ₅ /ノルベゲンシス DB8 + 1911	mg/L	時間
	90	3.3
	130	4.8
	200	7.3
	260	9.6

3.0 mLで処理し、2,6ジクロルインドフェノールで検定することにより細胞内に存在する還元型化合物の量を測定した。レガラクトノーガンマラクトンのレーアスコルビン酸への転化は次のカンディグ種において観察され、これを表VIに示す。

実施例Ⅲ

ガラクトース誘導体、好みしくはレガラクトノーガンマラクトンをレーアスコルビン酸へ転化できる微生物を選択するために、スクリーニングプログラムを開発した。エンジニア化化合物を生産しようと報告された種々の酵母からカンディグ属の微生物が選ばれた。

多数のカンディグ種は各地の培養物コレクション、例えばメリーランド州ロブタビルのアメリカン・タイプ・カルチャーリー・コレクション、デルフト（Delft）のセントラルビュロー・オーフ・オール・シメルカルチャー（Central Bureau voor Scheikundige culturen），パリのパストール研究所（Institute Pasteur）およびイリノイ州ペオリアのノザーン・リージョン・リサーチ研究所（Northern Region Research Lab.）から容易に入手でき、スクリーニング実験の前に培養物を入手して精製した。これらの培養物は0-1年刻度で貯蔵またはその他の栄養増殖で増殖した。

0-1年で2-4時間増殖させた酵母の斜面培地の食塩水懸濁液を細胞として用いた。500 mLの脱化半胱酸のエルレンマイヤー・フラスコ内の無菌S X-1培地（エタノール1.5% /v/v 塵末0.2%）50 mLあたり細胞懸濁液0.5 mLを細胞が進入しないようにして加えた。レガラクトノーガンマラクトンを低濃度にして冷却フラスコに添加した。このフラスコを回転振とう器上に置き、200 rpm, 30°Cで4.8時間通気した。精製化したプロセスはレーアスコルビン酸の生産について試験した。遠心分離にかけて洗浄した細胞ペーストを10 mLトリクロル酢酸

B. 7
レーザコルビン酸 ($\text{L}-\text{AAH}_2$) の生成

供生物	入手量			プロセス			細胞収量		
	No.	kg	kg	No.	kg	kg	No.	kg	kg
(C. norvegensis)	GB5	1911	10780	1113	11693		(C. ingens)	D35	4603
(C. vulgaris)	MRBL	Y-2784	140	168	203		(C. urvensis)	C68	1869
(C. apiculata)							(C. Justianiae)	C88	4413
(C. apiculata)							(C. berbeticus)	ATCG	18608
(C. apiculata)							(C. maltaea)	ATCG	20184
(C. apiculata)							(C. lanfermitii)	ATCG	22972
(C. apiculata)							(C. parapatelia)	ATCG	22119
(C. apiculata)							(C. pseudoloxosz)	ATCG	28140
(C. apiculata)							(C. maltaea)	ATCG	22685
(C. apiculata)							(C. olivacea)	ATCG	611
(P. ramosissima)	MRBL	Y-7771	420	546	966		(C. remakii)	C68	147
(P. ramosissima)	MRBL	Y-94	4130	2520	6650		(C. remakii)		147
(C. variabilis)							(C. remakii)		

供生物	入手量			プロセス			細胞収量		
	No.	kg	kg	No.	kg	kg	No.	kg	kg
(C. ingens)							(C. ingens)	D35	4603
(C. urvensis)							(C. urvensis)	C68	1869
(C. Justianiae)							(C. Justianiae)	C88	4413
(C. berbeticus)							(C. berbeticus)	ATCG	18608
(C. maltaea)							(C. maltaea)	ATCG	20184
(C. lanfermitii)							(C. lanfermitii)	ATCG	22972
(C. parapatelia)							(C. parapatelia)	ATCG	22119
(C. pseudoloxosz)							(C. pseudoloxosz)	ATCG	28140
(C. maltaea)							(C. maltaea)	ATCG	22685
(C. olivacea)							(C. olivacea)	ATCG	611
(C. remakii)							(C. remakii)	C68	147
(C. remakii)							(C. remakii)		147

供生物	入手量			プロセス			細胞収量		
	No.	kg	kg	No.	kg	kg	No.	kg	kg
(C. utilissima)							(C. utilissima)	Y-900	9660
(R. anomala)							(R. anomala)	ATCG	20029
(O. officinalis)							(O. officinalis)	ATCG	1610
(T. lepidotum)							(T. lepidotum)	ATCG	15239
(T. lanigerum)							(T. lanigerum)	ATCG	20390
(T. lanigerum)							(T. lanigerum)	ATCG	8661
(C. graminicola)							(C. graminicola)	IP	47
(C. sepiaceoides)							(C. sepiaceoides)	IP	207
(O. pseudopropinquum)							(O. pseudopropinquum)	IP	513
(C. paludicola)							(C. paludicola)	IP	606
(C. melittaria)							(C. melittaria)	IP	622
(O. robusta)							(O. robusta)	IP	826
(T. candida)							(T. candida)	ATCG	10539
(C. glomerata)							(C. glomerata)	ATCG	22978

実施例 V

エアーリフト発酵器は通常の搅拌-振動式発酵器に比べていくつかの明らかな利点を有している。中でも、酵素の改善された大量導送、電力需要量の低減、および機械的に拘束される発酵器に存在する高度の拘束力と比べたときのより柔軟な微生物培養環境が挙げられる。これらの特徴ゆえに、エアーリフト発酵器は工業規模で使用するのに適する。以下の実施例はカンディダ属酵母を使ってビタミンDを製造するためのエアーリフト発酵器の使用について示す。

4.0.2の実験室規模のエアーリフト発酵器に、エタノール2.75% w/v、グリシン0.7% w/oおよびレガラクトノーガン-4ラクton 0.5%を含有する無菌のグリシン培地(pH 4.1)を装填した。この発酵器は0-24時間(2.5%)フラスコからの洗浄したC. norvegensis KCCM F-42細胞の24時間粘菌液を接种した。0時間での生存細胞数は 5.5×10^6 個であった。発酵器の通気は1.94空気/l・時間培地/分³容量/質量/分³に調節し、こうして $3.0 \text{ m}^3/\text{h}$ のサイクル速度を得た。30℃で24時間後、生存細胞数は 1.1×10^9 個に増え、48時間で 3.0×10^9 個に、そして72時間では 2.8×10^9 個であった。培養後9時間で生存細胞数は 1.7×10^9 個であった。0.72 L/4のレーザコルビン酸が生成された。

実施例 VI

同様のエアーリフト発酵器を用いる実験で、高細胞密度発酵を行つた。この場合にはC. norvegensis KCCM F-42の24時間生細胞ペーストを4.0 Lの発酵器内の8倍-1倍培地

(グリシン 0.7% および L-ガラタトノーガンマラクトン 0.7% 含有) K 100 g / L の量で分散した。酵母の増殖または生産性を阻害せぬ程度しない量 (0.1 ~ 0.3%) でエタノールを逐次的に供給し、1 : 1 の酸素-空気比で発酵槽へ酸素富化通気を行つた。全混合ガス容積は 1.7 容量 / 容量 / 分であつた。これらの条件下において、発酵槽の上部区域は 30% の酵母濃度とレベルを維持した。発酵後 2 時間でレーアスコルビン酸は 1.44 g / L 生産された。

実験例

この実験例は高細胞密度の生物活性条件を用いるレーアスコルビン酸の製造について示す。カンディダ・ノルベゲンシス KF-78 タフト社の玄米株 (ATCC 20732, 玄) および (1) に示す系図を有する) を 3 日間斜面培地 (グルコース 0.5%, トリプチカーベーブト 0.2%, 酒母エキス 0.5%, 玄天 1.5%) 上 30°C で 24 時間培養した。6 本の斜面培地から酵母細胞は 3.0 L メンブレン式発酵槽内の無菌 8 L - 1 グルコース培地 (グルコース 1.5%, トウモロコシ浸出液 0.5%, グルタミン酸メノナトリウム 0.2%, 選化アンモニウム 0.1%, グリシン 0.02%, 脱ラクトースホエー選化物 0.1%, MgSO₄ 0.005%, レーガラタトノー 1.4 ラクトン 0.02%) 2.0 L を接種するに使用した。この細胞を 30°C, 200 rpm で培養し、0.5 L 容量 / 容量 / 分で 24 時間通気した。

この酵母液 (20 L) は、第 1段階の酵母バイオマス発酵を行つてその後の高細胞密度生物活性化で使用する細胞量を得

るために、無菌条件下無菌 8 L - 1 グルコース培地 + 9.2 L を含む 7.5 L のステンレス鋼タマゴ (Chesapeake) 発酵槽へ移した。発酵条件は 30°C、搅拌速度は 200 rpm、そして通気速度は 0.54 容量 / 容量 / 分であつた。培地の pH は最初 4.0 に調節し、その後生長相の間 pH 2.6 に降下させた。発酵後 1.7 時間で培養プロセスを 4°C まで冷却し、遠心分離によつて細胞を回収した。酵母の塊は乾燥細胞重量、光学密度 (OD) 6.00 nm、および標準平板菌数計算用深天 (Standard Plate Count Agar) (オヤシイド) 上の金コロニーの平板菌数により監視した。細胞ベーストの平均収量は 1.072 L でもつた。エタノールを脱着基質として増殖させた酵母からの細胞ベーストの収量も同じであつた。これらの細胞は第 2段階のレーアスコルビン酸製造のための生物活性方法において使用した。

レーガラタトノー 1.4-ラクトンをレーアスコルビン酸へ転化する生物活性化方法は、脱ラクトースホエー選化物 0.1 g / V を添加した無菌グリシン (0.7 g / V) 培地 5.0 L を含む 7.5 L のニューブルンズウイックガラス発酵槽 (New Brunswick glass fermenter) 内で実施した。低温放置したエタノール 1.5 g / V およびレーガラタトノー 1.4-ラクトン 1.5% の補足分を添加した。その後 pH 5.2 のこの無菌培地に培地 1 L 当たり酵母細胞ベースト (C. ノルベゲンシス K00 VF-78) 1.50 L を細胞が漏出しないようにして加えた。酵母浓度はニューブルンズウイック酸プローブで監視した酸素補充空気を用いて和田の 3.0% 程度に維持した。活性化反応の期間中は搅拌を 3.5 rpm KC 放定し温度を 28°C に保つた。生産

過程の間にエタノール濃度が 0.2% v/v へと低下し、以後は 0.2 ~ 0.5% のエタノール濃度を保持するように定期的に補足した。レーガラタトノー 1.4-ラクトン基質の濃度はその基質を 4 ~ 8 時間の間隔で添加することにより 1.2 ~ 1.6% の範囲に保持した。

レーアスコルビン酸の生産は HPLC 電気測定用プローブと共にアミネクス (Aminex) HPX-B 5 出口を用いる HPLC 分析によつて逐次的に監視した。また、レーアスコルビン酸は 2,6-ジクロルインドフェノールを用いる酸化還元色素滴定法によつても簡単に調べた。

生物活性化の結果は、最初の 2 時間の初期段階に 0.32 g / L / 母のレーアスコルビン酸生産量が得られることを示している。10 時間後にはその生産量は 0.20 g / L / 時 (10 時間) へと徐々に低下し、そして最後の 1.6 時間では 0.15 g / L / 時に低下した。レーアスコルビン酸の最終的収量は上記プロセスにおいて 7.35 g / L であつた。ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を 1 mg / ml 添加することによりプロセス中に存在する酵母細胞を溶解すると、最終力量が 7.51 g / L に増大した。

実験例

レッドスターベーカー (Red Star baker) のビール酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*; この酵母はレーアスコルビン酸過剰生産性でない) 907 g (2 ポンド) をザーゴロフ (Zagoloff) の方法 [ジエイ・バイオロ、ケム, (J. Biol. Chem.) , 244, 5020 (1969) を参照] に従つて繁殖した。この液状粉末 900 g を 0.4 M 酢酸、0.05 M トリス (ヒドロ

キシメチル) アミノメターン (トリス-HOCl) pH 8.2 および 1 ミリモルのエテレンジアミン四酢酸 (EDTA) からなる溶液 1.5 L へ移した。この酵母液の pH を水酸化ナトリウムで 7.5 に調節し、その後ブレンダーで 45 秒間かモジナイズした。ホモジネートを 4°C において 1.5 分間 2500 × g で遠心分離し、細胞破片を捨てた。上清はシャーピレス (Sharples) 遠心分離器を使って 62000 × g で遠心分離にかけた。沈殿物 (ミトコンドリア) を採取して 0.25 M 蔗糖および 0.01 M トリス-HOCl pH 7.5 を含む溶液 250 mL 中に懸濁し、そして溶解した。

2 mL レーガラタトノー 1.4-ラクトンおよび 5.0 mM エンザム Na pH 6.8 を含む供試混合物を全量 3 mL 用意した。この混合物を恒温槽中 37°C で 30 分までインキュベートした。5.0 g TCA 0.3 mL を加えることにより反応を止めた。析出した蛋白質を遠心分離で除き、上清は電気化学的検出をともなう高活性液体クロマトグラフィーおよび 2,6-ジクロルインドフェノール滴定を用いてレーアスコルビン酸について検定した。

代表的な検定を第 2 図に示す。この試料の比活性を計算すると 2.5×10^{-3} ミクロモル / 分 / mg (蛋白質) である。第 3 図に示すように最適濃度は 3.7% であり、また第 4 図に示すように最適 pH は 6.8 であると決定された。反応速度定数 k_{on} および V_{max} は $0.1 \sim 5.0 \text{ mM}$ の範囲のレーガラタトノー 1.4-ラクトン基質濃度を用いて決定した。その反応速度定数 k_{on} は $1.6 \times 10^{-3} \text{ M}$ であり、反応速度定数 V_{max} は 0.34 (クモセル / 分) であると決定された (第 4.5 および 6 図を参照)。

無機のミトコンドリア系についてこれらの反応速度定数を決

定した後、酵素活性をミトコンドリアから分離させることにより酵素をさらに精製した。この酵素を可溶化させるために粗骨炭処理および各種の洗剤を試験した。

一連の5種の洗剤：すなわち 1) ノカルフェノール P O I - 9 (XP-9), 2) ポリテクト (P-40), 3) オクタルダルコシド, 4) [3-(3-コラミンドプロピル)-ジメチルアンモニオ] 1-プロパンスルホキート (CHAPS), および 5) [3-(3-コラミンドプロピル)-ジメチルアンモニオ]-2-ヒドロキシ-1-プロパンスルホキート (CHAPSO) を試験した。CHAPSO が特に効果的であることがわかつた。この結果を表中に要約する。さらに CHAPSO はミトコンドリアから酵素を選択的に分離させて、この実験で Michaelis の場合よりも 1.6 倍大きい比活性を有する調製物を与えた（アーナ・バイオケム、アンドバイオファイズ、(Aeron Biochem, & Biophys.) 191, 476 (1978) を参照）。各種の酵母体のオキシダーゼ活性の比較を表中に示す。

酵母	活性の比較 (単位/ミクログラム)	活性性 (単位/1000 ミクログラム)		単位/分
		1.6	1.5-1.9	
ビール酵母 (<i>S. cerevisiae</i>) レーラクタノ-1,4-ラクトンオキシダーゼ	1.6	1.6	1.6	0.023
ニシキニ (Nishikihihi)	—	—	—	—
0.クナツク (C. utilis) (NRRL Y-900)	—	—	—	—
0.ノルベゲンシス (<i>C. norvegensis</i>) (CBS 1911)	—	—	—	—
0.ノルベゲンシス (<i>C. norvegensis</i>) (NP-42)	—	—	—	—
0.ノルベゲンシス (<i>C. norvegensis</i>) (NP-64)	—	—	—	—

* 1 単位 = 1 クロモル/分

表中の各菌体の酵素のための最適温度および最適 pH はそれぞれ 37℃ および pH 6.8 であることがわかつた。

酵母ミトコンドリアまたはさらに精製した酵素は、次の実験例に示すように、レーアスコルビン酸の連続生産用の固定化レーガラクトノ-1,4-ラクトンオキシダーゼカラムを作る際に用いられる。

実験例 II

実験例Ⅰで調製したミトコンドリア酵素液 (蛋白質 1.1 g を含む) 1.0 ml をアルギン酸 0.5% 溶液 5.0 ml と混合した。この混合物を 1.8 ゲージの針を通して 0.25 M 硫酸、0.1 M CaCl₂ および 1.0 mM PIPES pH 6.8 からなる溶液 1.0 ml 中に押出して 4°C で 24 時間浸漬した。これにより直径が 9 mm の均質なビーズを得た。

固定化ミトコンドリア酵素を使用する「バッテ式」生物活性を説明するために、蛋白質 0.11 g を含むビーズ 2 g を標準反応混合物 3 ml 中 37°C で 20 分間恒温とした。検定は上清中にレーアスコルビン酸が 7.7 μM/mg 存在することを示した。

固定化ミトコンドリア酵素を使用する連続生物活性化法を説明するために、0.9 × 30 cm のカラムにビーズを充填して 37°C に保持した。2 ml レーガラクトノ-1,4-ラクトンおよび 1.0 mM ピペラシン-*N*-ビペラシン (2-エタノスルホ酸) (PIPES) pH 6.8 を含む供給液をカラムにポンプ注入した。3.2 ml/分の流量で 5 分後には流出液中のレーアスコルビン酸が 5.3 μM/時間増加した。

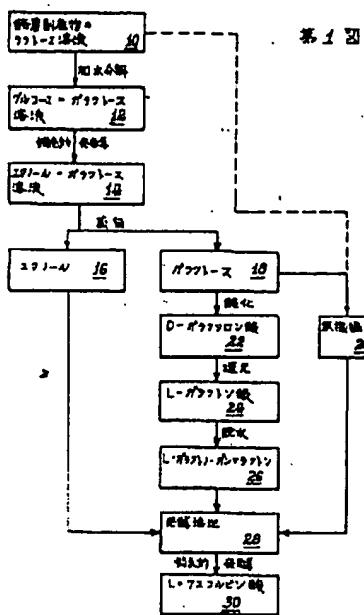
実験例 X

カンディダ・ノルベゲンシス CBS 1911 およびカンディダ・ウチルス NRRL Y-900 の 2 種の酵母を、レーガラクトノ-1,4-ラクトンまたは D-ガラクトロン酸メチルエステルの 2 つの異なる基質のそれぞれを用いる別の生物活性実験においてエタノール液でもつて利用した。この生物活性実験は好気的条件下に生物活性用培地 5.0 ml を含む耐化半胱酸の 50.0 ml フラスコ内で、200 rpm で迴転の瓶という器を使ってかきまぜながら 30°C の温度で 4-6 時間実施した。0.ノルベゲンシス用の培地はエタノール 1.5 ml および基質 0.6 ml を含む初記 5 M-1 培地であつた。0.ウチルス用の培地はエタノール 1.0 ml および基質 0.2 ml を含む 5 M-1 培地であつた。結果は次の通りである。

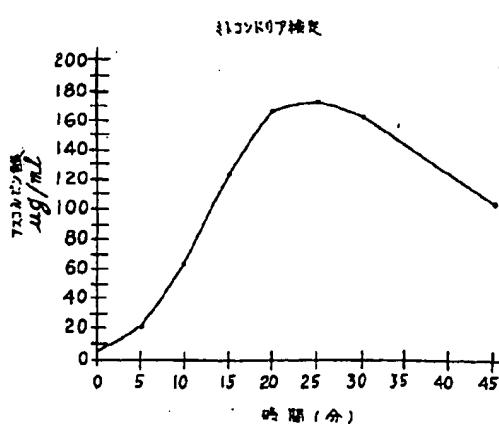
	CBS 1911	CBS 1911	NRRL Y-900	NRRL Y-900
基質	1 *	2 **	1 *	2 **
光学密度	2.05	2.60	8.50	8.50
レーアスコルビン酸 μM/ml **	9.28	3.5	5.00	1.20
他の氧化還元 化合物 μM/ml	1.01	1.75	1.8	1.3
全アスコルビン酸 μM/100ml	10.625	4.73	15.905	4.383

- * レーガラクトノールマークントン
- ** ローガラクフロン酸メチルエステル
- *** アスコルビン酸は電気化学検出をともなうHPLC分析で開発した。

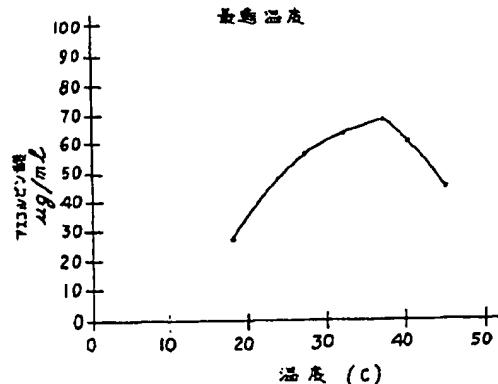
本発明により、アスコルビン酸製造のための有用かつ新規な方法、微生物および培地が提供されたことは先の記述より認められるであろう。本発明の種々の面を特定の実施態様に関して詳細に述べてきたが、いろいろな変更ならびに改良が本発明書の記述から明らかになるであろうし、これらもまた本発明の精神および範囲内に含まれかつ次の請求の範囲に包含されるものである。



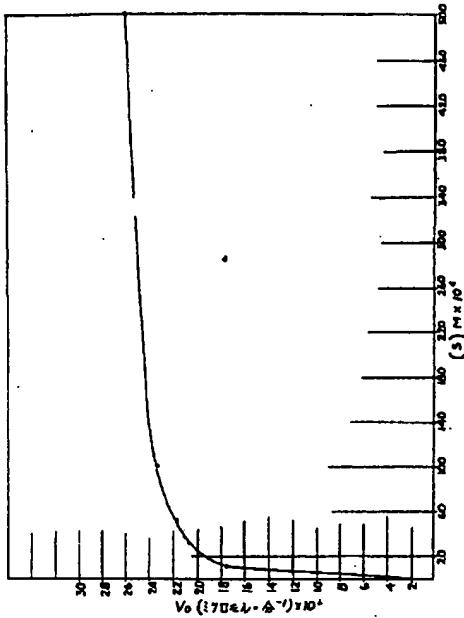
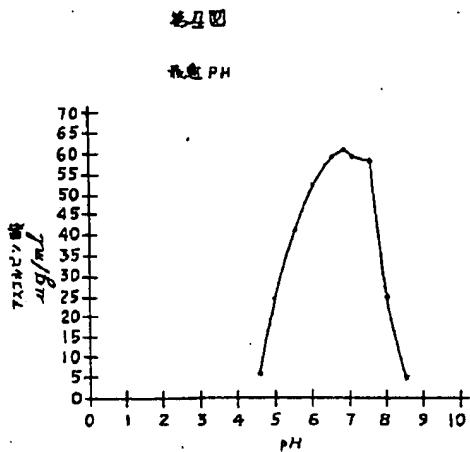
第2図



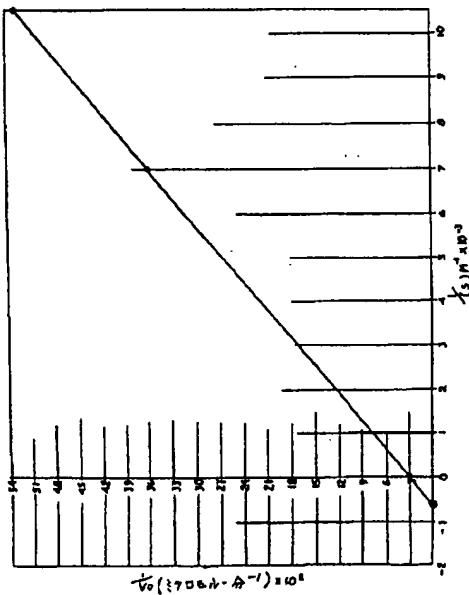
第3図



四
五



四六



International Application No. PCT/US88/01605		
A. DOCUMENTATION OF SUBJECT MATTER & SOURCE OF INFORMATION		
Applying to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC:		
IPC: C12P 7/62; C12M 1/00; C12M 1/16; C12M 11/12		
4. PUBLICATION NUMBER		
Classification System: Without Disclosure Document		
Classification Number: Classification Number		
U.S. : 435/195, 176, 177, 179, 282, 183, 290, 243, 247, 250, 255, 256		
International Search Report from Worldwide Cooperation to the kind of case this Application is included in the Paris Convention		
CA Search Database: 1978-1984		
LEXPAT Database : 1975-1984		
B. DOCUMENTS REFERRING TO THE INVENTION		
List all documents which you consider relevant to your application, of whatever nature they may be.		
Entered in Order No. 10		
Y	M. Heick et al., Can. J. Microbiol. Vol. 16 1978, pages 597-600	1-16, 19, 22-27
X	M. Ellegaard et al., Eur. J. Biochem. Vol. 127 1982, pages 391-396	1-4, 12, 16
X	M. Ellegaard et al., Eur. J. Biochem. Vol. 127 1982, pages 391-396	1-15, 19, 22-27
Y	M. Koguchi et al., J. Biochem. Vol. 90, 1981, Pages 33-38	1-15, 19, 22-27
X	M. Kishimoto et al., Arch. Biochem. Biophys. Vol. 191, 1978, pages 479-485	1-15, 19, 22-27
Y	M. Murakami Indan, Sixth Edition, Windholz et al. (ed.), 1976, Marcup & Co. Inc., Rahway, N.J., pages 906 and 1054	10
Y	Handbook of Chemistry and Physics, Forty-Ninth Edition, Yeast (ed.), 1968 The Chemical Rubber Co., Cleveland, Ohio, Pages S-126 - S-127	10
* Special categories of cited documents**		
** If the document has not been published in the language in which it is written, or if it is not intended to be published in that language, indicate the language in which it is written, or the language in which it is intended to be published, and the language in which it is understood to be understood.		
* If the document has not been published or has not been filed in the country where the application was filed, indicate the country in which it was published or filed.		
* If the document contains any secret or private information or consists of notes, sketches, or other material not intended for general disclosure, indicate the extent of such secrecy or privacy.		
* If the document refers to one or more tables, indicate the number of each table.		
* If the document refers to one or more figures, indicate the number of each figure.		
* If the document refers to one or more tables or figures, indicate the number of each table or figure.		
* If the document refers to one or more tables or figures, indicate the number of each table or figure.		
* If the document refers to one or more tables or figures, indicate the number of each table or figure.		
* If the document refers to one or more tables or figures, indicate the number of each table or figure.		
C. INTERNATIONAL SEARCH		
Date of the Authorized Examination of the International Search:		
31 December 1984		
Date of Filing of the International Search Report:		
10 JAN 85		
International Searching Authority:		
Commission of Antwerp		
Name of International Searcher:		
James Martinelli		
ISA/US		

PENTHER INFORMATION CONTAINING FROM THE SEARCH SHEET		
Y	US, A, 4,397,949, published 09 August 1983 Peters et al.	13, 22-24
Y	WO, A, 8100576, published 03 March 1981, Hagerdal et al.	13, 22-24
Y	US, A, 4,246,348, published 20 January 1981 Lanilloots et al.	1-27
Y	DE, A, 2047268A, published 26 November 1980 Vegner	21

V-1 INVESTIGATIONS OTHER THAN THOSE LISTED ON THIS SHEET

The International search report has not been supplemented in respect of certain states under Article 17(3) (a) for the following reasons:

One or more countries where the prior art was reported were not required to be examined by the International authority.

One or more countries where the prior art was reported were not examined by the International authority to such an extent that no meaningful assessment could ever be made and it is unnecessary.

V-2 INFORMATION WHICH MAY BE DELETED OR OMITTED

The International Searching Authority listed certain sections in the International application as follows:

All or part of the additional search fees were freely paid by the applicant, the International search report does not contain any of the International authorities.

As only some of the reported additional search fees were freely paid by the applicant, the International search report does not show names of the International authorities for which fees were paid, specifically those.

No additional search fees were freely paid by the applicant. Consequently, no International search report is available in the countries first mentioned or the following is provided by other countries.

All or part of the additional search fees were freely paid by the International Searching Authority or by another International authority.

The additional search fees were compensated by applicants自己.

No additional search fees were compensated by applicants自己.

PENTHER INFORMATION CONTAINING FROM THE SEARCH SHEET		
Y	US, A, 4,001,437, published 01 January 1977 Jaeggi et al.	21
Y	EP, A, 0050571, published 28 April 1982, Kallige et al.	7-11
Y	M, American Type Culture Collection Catalogue of Strains, Fifteenth Edition, 1983 American Type Culture Collection, Rockville, MD, page 309	16-18,23
Y	M, American Type Culture Collection Catalogue of Strains, Fifteenth Edition, 1983 American Type Culture Collection, Rockville, MD, page 309	16-18,20
Y	M, American Type Culture Collection Catalogue of Strains, Fifteenth Edition, 1983 American Type Culture Collection, Rockville, MD, page 312	16
Y	M, American Type Culture Collection Catalogue of Strains, Fifteenth Edition, 1983 American Type Culture Collection, Rockville, MD, page 312	16,27

Form PCT/USA/01695 (Supplemental Sheet 02) (Version 1982)

Form PCT/USA/01695 (Supplemental Sheet 02) (Version 1982)

第1頁の続き

②Int.Cl.*

識別記号

厅内整理番号

C 12 N 11/02
//C 12 P 17/04
(C 12 R 1:72)
(C 12 N 1/16
C 12 R 1:72)

7235-4B

③発明者 デインウッディー, ロバート・

チャールズ

アメリカ合衆国イリノイ州60025, グレンビュー, グリーン・ヴィ

ロウ・レイン 1340, アパートメント・エイ

④発明者 メーナート, デービッド・ウェ
ブアメリカ合衆国イリノイ州60046, レイク・ヴィラ, オーク・レイ
ン・ドライブ 101

? S PN=JP 61500201
S2 1 PN=JP 61500201
? T S2/7

2/7/1

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI
(c) 2006 Thomson Derwent. All rts. reserv.

004283483

WPI Acc No: 1985-110361/198518

Fermentative ascorbic acid prodn. from galactonic acid derivs. - using over-productive microorganisms esp. *Candida norvegensis* mutants

Patent Assignee: KRAFT INC (KRFT); ROLAND J F (ROLA-I)

Inventor: CAYLE T; DINWOODIE R C; MEHNERT D W

Number of Countries: 008 Number of Patents: 006

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week	
WO 8501745	A	19850425	WO 84US1695	A	19841019	198518	B
EP 146239	A	19850626	EP 84307259	A	19841022	198526	
JP 61500201	W	19860206	JP 84504007	A	19841019	198612	
DK 8502802	A	19850620				198620	
US 4595659	A	19860617	US 83543975	A	19831020	198627	
US 4916068	A	19900410	US 85749538	A	19850618	199020	

Priority Applications (No Type Date): US 83543975 A 19831020

Cited Patents: 3.Jnl.Ref; A3...8646; No-SR.Pub; EP 50571; GB 2047268; US 4001437; US 4246348; US 4397949; WO 8100576

Patent Details:

Patent No Kind Lan Pg Main IPC Filing Notes

WO 8501745 A E 52

Designated States (National): DK JP US

EP 146239 A E

Designated States (Regional): DE FR GB IT NL

Abstract (Basic): WO 8501745 A

Prodn. of L-ascorbic acid (I) comprises fermenting a medium contg. (1) L-galactonic acid (II), its lower alkyl esters and/or L-galactono-gamma-lactone (III) as substrate and (2) EtOH and/or glycerol as C source with a (2)-utilising microorganism which is overproductive of (I) from these substrates. Culture is carried out under aerobic conditions.

In modifications, (III) is converted to (I) using immobilised L-galactono-1,4-oxidase, or the D-analogues of the substrates are used.

Microorganisms overproductive of (I) and able to transport (I) across cell and mitochondrial membranes are claimed.

USE/ADVANTAGE - (I) can now be prep'd. from waste prods. of food processing. Yields of at least 1g/l and achieved with only minimal prodn. of (I) analogues, e.g. D-erythroascorbic acid.

0/6

Abstract (Equivalent): US 4916068 A

L-Ascorbic acid is produced by bioconversion using a L-galactano-1,4-oxidase enzyme from *Candida norvegensis* MF-56 (ATCC 20686), MF-78 (ATCC 20732) or related L-ascorbic acid overproducing mutant strain having activity of 6,600 micro-mol. per min. per mg protein.

Process comprises (a) immobilising the enzyme; (b) contacting it with aq. bioconversion medium contg. 2.0 mmol. or more of L-galactono-1,4-lactone; (c) maintaining O₂ level of 3.0 ppm or more in medium to enable conversion; and (d) recovering prod.

ADVANTAGE - Can be operated in conventional aerobic fermentation

modes, e.g. batch, continuous semicontinuous. (19pp)

US 4595659 A

Novel L-ascorbic acid mfr. comprises (a) forming an aq. fermentation medium contg. L-galactonic and/or at least one of its lower alkyl ester(s), L-galactono-gamma-lactone as substrate, ethanol, glycerol as C-energy source; (b) adding a Candida yeast or its mutant strain which is overproductive in L-ascorbic acid synthesis, which uses the C-source; and (c) aerobically culturing to consume C-source and accumulate prod.

Pref. medium contains an N-source, minerals for growth, and 0.5 wt.% or more of glycine to enhance prodn. at pH 2.5-6.5. Aerobic conditions comprise 20% or more O₂-satn.

ADVANTAGE - Ethanol and substrate are derived from a dairy by-prod. lactose source or citrus pectin. (10pp)

Derwent Class: B03; D16; E13

International Patent Class (Additional): C12N-001/00; C12N-009/04; C12N-011/14; C12P-007/62; C12P-009/60; C12P-017/04; C12R-001/72

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

BLACK BORDERS

IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

FADED TEXT OR DRAWING

BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

SKEWED/SLANTED IMAGES

COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

GRAY SCALE DOCUMENTS

LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.